

マウス舌神経損傷による舌神経障害性疼痛の性差に対する
中枢神経系免疫細胞の役割

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野

坂梨 公亮

(指導：篠田 雅路 教授, 坪井 美行 専任講師)

要旨

目的：近年，上行性侵害情報伝達系およびその可塑的変化メカニズムに性差があることが報告されているが，舌神経障害性疼痛の発症メカニズムに性差があるかどうか不明である。本研究では，舌神経損傷モデルマウスを用いて，舌神経損傷後の舌機械アロディニアおよび熱痛覚過敏の性差に対する中枢神経系の免疫細胞の役割を解明することを目的とした。

方法：雄性および雌性マウスの左側舌根部粘膜を切開して舌神経を露出した後，30gで30秒間舌神経を圧迫し，舌神経損傷 (LNI) モデルマウスを作製した。LNI 前およびLNI 後1日目から15日目まで，浅麻酔下にて舌尖部に機械または熱刺激を加え，それぞれの頭部逃避反射閾値 (HWRT) を1日おきに測定した。LNI 後3日目，大槽内にミクログリア活性化阻害薬であるミノサイクリンまたはT細胞に発現するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体 γ アゴニストであるピオグリタゾン投与し，投与0.5, 1, 2および24時間後の機械または熱刺激に対するHWRTを測定した。

結果：LNI 後1日目より9日目まで，雄性および雌性マウスともに機械または熱刺激に対するHWRTが有意に低下した。LNI 後1, 5, 7および9日目において，雄性マウスの機械刺激に対するHWRTは雌性マウスと比較して有意に低かった。LNI 後，両性間で熱刺激に対するHWRTに差は認められなかった。大槽内ミノサイクリン投与後，LNI 後の機械または熱刺激に対するHWRT低下の抑制が雄性マウスでのみ認められた。一方，大槽内ピオグリタゾン投与後，LNI 後の機械または熱刺激に対するHWRT低下の抑制が雌性マウスでのみ認められた。

結論：舌神経損傷後の舌神経障害性疼痛の性差には，上行性侵害情報伝達系の興奮性を調節する免疫細胞の相違が関与することが示唆された。

キーワード：舌神経損傷，舌神経障害性疼痛，ミノサイクリン，ピオグリタゾン，マウス

Abstract

Purpose: Recently, it has been reported that there is sex difference in the ascending nociceptive pathway and its plastic change mechanism, but it is unclear whether there was sex difference in the mechanism of tongue neuropathic pain. The purpose of this study is to assess potential sex difference in the role of immune cells in the central nervous mechanism in tongue mechanical allodynia and heat hyperalgesia after lingual nerve injury in mice.

Methods: After exposing the lingual nerve in male and female mice, lingual nerve injury (LNI) was performed by the compression of the lingual nerve for 30 seconds at 30 g. Before LNI and 1-15 days after LNI, mechanical or heat stimulation was applied to the tip of the tongue under light anesthesia, and the head withdrawal reflex threshold (HWRT) was measured once every two days. On day 3 after LNI, minocycline which is a microglial activation inhibitor or pioglitazone which is an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor γ expressed in T cells was administered into the cisterna magna. HWRT to mechanical or heat stimulation was measured 0.5, 1, 2 and 24 h after the administration.

Results: From day 1 to day 9 after LNI, HWRT to mechanical or heat stimulation was significantly decreased in male and female mice. On days 1, 5, 7 and 9 after LNI, HWRT to mechanical stimulation was significantly lower in male mice than that of female mice. After LNI, there was no significant difference in HWRT to heat stimulation between both sexes. After minocycline administration, the decrease of HWRT to mechanical or heat stimulation by LNI was suppressed only in male mice. On the other hand, after pioglitazone administration, the decrease of HWRT to

mechanical or heat stimulation by LNI was suppressed only in female mice.

Conclusion: These results suggested that sex difference in tongue neuropathic pain after lingual nerve injury involves the difference in immune cells existing in the central nervous system and regulating the ascending nociceptive pathway.

Keywords: lingual nerve injury, tongue neuropathic pain, minocycline, pioglitazone, mouse

緒 言

舌は筋線維が縦横に走行し多彩な運動ができる運動器であり、特殊感覚である味覚の受容器¹⁾と体性感覚である痛覚や触覚の受容器を配する感覚器でもある。舌に存在する自由神経終末に Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の発現が認められ、TRPV1 が舌の痛覚に関与していることが報告されている^{2,3)}。さらに、舌癌^{4,5)}、舌炎^{6,7)}や舌乾燥⁸⁾は、舌からの侵害情報の三叉神経感覚核における処理機構の変調を惹き起こし、舌痛を発症すると報告されている。しかし、舌からの侵害情報の三叉神経感覚核における処理機構の性差に関する研究はほとんどない。

歯科臨床において、口腔内灼熱症候群 (BMS) 患者は、臨床的に明らかな原因を認めず、1日に2時間以上で3カ月以上続く舌痛またはピリピリした不快な舌異常感覚を訴え⁹⁾、食事の際には香辛料や熱い食物で痛みが増悪することが知られている¹⁰⁾。また、BMSは全人口の0.7~3%に発症するとされており、患者の男女比は1:8~1:10で、特に更年期の女性に多く発症する¹¹⁻¹⁵⁾。BMS患者は女性が多く、舌に原因となる器質的変化が無いことから、BMSは中枢神経系の変調によって発症し、その発症機構には性差があることが示唆される。

近年、Sorgeら¹⁶⁾はマウスの坐骨神経損傷後や足底の炎症によって惹起される疼痛の強度および中枢神経系の機能的変化には性差があることを報告した。その報告では、雄性マウスではミクログリア、雌性マウスではT細胞の中枢神経系における機能的変化が異常疼痛強度の変調に関与することが示唆されている。さらに雌性マウスにおいて、T細胞に発現するペルオキシソーム増殖因子活性化受容体2 γ (PPAR2 γ) シグナルを介した

Interleukin-17A (IL-17A) の産生抑制が異常疼痛発症を抑制している。この結果から、中枢神経系における機能的変化による異常疼痛強度の変調には性差があることが強く示唆され、ミクログリア活性化阻害薬であるミノサイクリン投与および PPAR2 γ アゴニストであるピオグリタゾン投与による異常疼痛強度の変調には性差があることが予測される。

本研究では、雄性および雌性マウスを用いて、舌神経の圧迫による舌神経損傷 (LNI) 後の舌への機械刺激および熱刺激による頭部逃避反射閾値 (HWRT) 低下に対するミノサイクリンおよびピオグリタゾン大槽内投与の効果を検討し、LNI 後の舌痛発症の性差に関わる中枢神経系における免疫細胞の役割を解明することを目的とした。

材料および方法

1. 実験動物

Institute of cancer research 系マウス (雄性マウス, n = 47, 7-12 週齢; 雌性マウス, n = 46, 7-12 週齢, 日本エスエルシー, 浜松) を実験に用いた。マウスは明 (7-19 時) / 暗 (19-7 時) サイクルの環境下で, 自由に水・餌が摂取できる状態で飼育された。雌性マウスにおいては, 全身麻酔下 (導入 4%, 維持 2.5% イソフルラン吸入, ヴィアトリス製薬, 東京) でインピーダンスチェッカー (MK-11, 室町機械, 東京) のプローブを膣に挿入して測定したインピーダンスにより性周期を判断し¹⁷⁾, 性周期に偏りがないように実験開始時期を設定した。本研究は, 日本大学動物実験委員会の審査後, 学長の承認を得て行われた (承認番号: AP20DEN003-4)。「日本大学動物実験運営規定」に従って実験を行い, 被験動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

2. LNI モデルマウスの作製

LNI モデルの作製は, Katagiri ら¹⁸⁾の方法を参考にした。全身麻酔下 (導入 4%, 維持 2.5% イソフルラン吸入) で, 左側の舌根部粘膜を切開して舌神経を露出し, ポリカーボネート樹脂クリップ (夏目製作所, 東京) を用いて舌神経を 30 秒間 30 g の強さで圧迫した。圧迫後, 切開部を 8-0 ポリアミド縫合糸 (ジーシーソフトレッチ, ジーシー, 東京) で縫合した。舌神経の圧迫のみを施行せず, 上記と同様の処置を行った群を Sham 処置群とした。

3. 舌の HWRT 測定

マウスに十分な全身麻酔 (導入 4%, 維持 2%イソフルラン吸入) を行った後, イソフルラン吸入を 0.5%に維持した。足底に対する 200 g 以下のピンチ刺激 (Rodent pincher - analgesia meter, BIOSEB, Vitrolles, France) で足ひっこめ反射が起こり, 呼吸数が毎分 180 ~ 200 回となる麻酔レベルに達したことを確認した後すぐに, 舌尖より 3 mm の左側舌部を Rodent pincher - analgesia meter を用いて機械刺激 (0-110 g, 5 g/sec, cut off: 110 g), または接触型熱刺激装置 (6×6 mm, インタークロス, 東京) を用いて熱刺激 (30-52 °C, 1 °C/sec, cut off: 52 °C) した。舌への上記の機械刺激または熱刺激に対する HWRT を測定した。それぞれ 2 回測定し, その平均値を各マウスの HWRT とした。刺激間隔は 3 分以上とした。

1 週間の飼育室での馴化の後, 1 日おきに 2 回, 舌への機械刺激または熱刺激に対する HWRT を測定した。その後, LNI または sham 処置を行った。処置後, 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 および 15 日目に機械刺激および熱刺激に対する HWRT を測定した。

4. 大槽内投与

LNI または Sham 処置後 3 日目に機械刺激および熱刺激に対する HWRT を測定後, 深麻酔下 (導入 4%, 維持 2%イソフルラン吸入) にて, マウス頭部を前屈した状態で後頭部皮膚より, SP10 チューブ (夏目製作所, 東京) とハミルトンシリンジが接続された 31G の歯科用注射針 (クルツァージャパン, 東京) を大槽内に刺入した。ハミルトンシリンジを用いて, ミノサイクリン (60.7 mM: minocycline hydrochloride in saline, Merck, Darmstadt, Germany), ピオグリタゾン (76.2 mM: pioglitazone hydrochloride in dimethyl sulfoxide

(DMSO), 東京化成工業, 東京), 生理食塩水 (0.9%, 大塚製薬, 東京) または DMSO を 10 μ l 大槽内投与した。各薬物の濃度設定は, Sorge ら¹⁶⁾ の報告を参考にした。投与 0.5, 1, 2 および 24 時間後に機械刺激および熱刺激に対する HWRT を測定した。

5. 統計学的解析

測定した各群における HWRT が, 等分散性および正規性を満たしていることを確認した。各群の HWRT は平均値 \pm 標準誤差で表した。有意差検定には, 繰り返しのある二元配置分散分析およびそれに続く Bonferroni test による多重比較検定を用いた。統計学的解析には, SigmaPlot version 14.0 (Systat Software, Palo Alto, CA, USA) を使用した。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. LNIによるHWRTの変化とその性差

図 1A に LNI 後の舌への機械刺激に対する HWRT の変化を示す。雄性マウスおよび雌性マウスにおいて、LNI 後 1, 3, 5, 7 および 9 日目の HWRT が、LNI 前の HWRT (雄性マウス: 96.5 ± 5.9 g; 雌性マウス: 101.9 ± 2.2 g, $n = 8$ in each) や Sham 処置群の HWRT (sham 処置後 1 日目, 雄性マウス: 77.8 ± 3.8 g, $n = 7$; 雌性マウス: 86.6 ± 4.8 g, $n = 8$) と比較して有意に低下した ($p < 0.05$)。雄性マウスでは LNI 後 1 日目 (30.3 ± 2.0 g) に、雌性マウスでは LNI 後 3 日目 (40.6 ± 5.1 g) に、HWRT が最も低下した。処置後 1, 5, 7 および 9 日目, 雄性マウスの HWRT は雌性マウスと比較して有意に低かった ($p < 0.05$)。

図 1B に LNI 後の舌への熱刺激に対する HWRT の変化を示す。雄性マウスにおいて、LNI 後 1 日目に HWRT (47.0 ± 0.7 °C) が最も低下し、LNI 後 1, 3, 5, 7 および 9 日目の HWRT は LNI 前の HWRT (50.5 ± 0.2 °C) や Sham 処置群の HWRT (sham 処置後 1 日目, 49.7 ± 0.9 °C) と比較して有意に低下した ($p < 0.05$)。一方、雌性マウスでは術前の HWRT (50.4 ± 0.9 °C) と比較して LNI 後 1, 3 日目で HWRT が有意に低下した ($p < 0.05$)。また、LNI 後 1, 3, 5 および 7 日目で Sham 処置群 (sham 処置後 1 日目, 50.8 ± 0.3 °C) と比較して有意に HWRT が低下していた ($p < 0.05$)。LNI 後 15 日目まで、雌雄間で HWRT の有意な差はなかった。

2. ミノサイクリンの効果

図 2A に機械刺激による HWRT の変化に対するミノサイクリンの効果を示す。雄性マ

ウスでは, LNI 前の HWRT (100.7 ± 2.0 g) と比較し, LNI 後 3 日目において, HWRT (33.2 ± 5.1 g) が有意に低下した ($p < 0.01$, $n = 6$ in each)。さらに LNI 後 3 日目におけるミノサイクリン大槽内投与 0.5, 1 および 2 時間後の HWRT (0.5 時間後: 88.0 ± 7.5 g, 1 時間後: 87.7 ± 7.2 g, 2 時間後: 46.1 ± 3.6 g) は, LNI 後生理食塩水投与群と比較して有意に上昇した ($p < 0.01$)。ミノサイクリン大槽内投与後の機械刺激に対する HWRT は, LNI 後生理食塩水投与群の HWRT と比較して差は認められなかった。雌性マウスでは, LNI 後 3 日目の HWRT は LNI 前と比較して有意に低下した (LNI 前: 96.1 ± 3.7 g, LNI 後 3 日目: 30.3 ± 4.3 g, $n = 6$ in each, $p < 0.01$)。

図 2B に熱刺激による HWRT の変化に対するミノサイクリンの効果を示す。雄性マウスでは, LNI 前の HWRT (49.4 ± 0.7 °C) と比較し, LNI 後 3 日目の HWRT (45.5 ± 0.7 °C) が有意に低下した ($p < 0.05$, $n = 6$ in each)。また, 術後 3 日目におけるミノサイクリン大槽内投与 0.5, 1 時間後の HWRT (0.5 時間後: 51.7 ± 0.3 °C, 1 時間後: 50.8 ± 1.0 °C, $n = 5$ in each) は, LNI 後生理食塩水投与群と比較して有意に上昇していた ($p < 0.01$)。ミノサイクリン大槽内投与後の熱刺激に対する HWRT は, LNI 後生理食塩水投与群の HWRT と比較して差は認められなかった。雌性マウスでは, LNI 後 3 日目の HWRT は LNI 前と比較して有意に低下した (LNI 前: 50.1 ± 0.2 °C, LNI 後 3 日目: 45.2 ± 1.0 °C, $p < 0.01$)。

3. ピオグリタゾンの効果

図 3A に機械刺激による HWRT の変化に対するピオグリタゾンの効果を示す。雄性マウスでは, LNI 前と比較して LNI 後 3 日目の HWRT が有意に低下した (LNI 前: 89.5 ± 2.5

g, LNI 後 3 日目: 25.3 ± 2.0 g, $p < 0.01$, $n = 6$ in each)。ピオグリタゾン大槽内投与は LNI 後 3 日目に低下した HWRT を変化させなかった。雌性マウスでは, LNI 前と比較して LNI 後 3 日目に HWRT は有意に低下した (LNI 前: 91.5 ± 3.4 g, LNI 後 3 日目: 32.0 ± 0.7 g, $p < 0.01$, $n = 6$ in each)。LNI 後 3 日目に低下した HWRT はピオグリタゾン大槽内投与 0.5, 1 および 2 時間後, LNI 後 DMSO 投与群と比較して有意に回復した (ピオグリタゾン大槽内投与群, 0.5 時間後: 77.1 ± 6.9 g, 1 時間後: 82.7 ± 9.9 g, 2 時間後: 52.6 ± 4.2 g, $p < 0.01$, $n = 5$ in each)。

図 3B に熱刺激による HWRT の変化に対するピオグリタゾンの効果を示す。雄性マウスでは, LNI 後 3 日目に LNI 前と比較して有意に HWRT は低下した (LNI 前: 49.0 ± 0.9 °C, LNI 後 3 日目: 44.8 ± 0.6 °C, $p < 0.01$, $n = 6$ in each)。LNI 後 3 日目に低下した HWRT は, ピオグリタゾン大槽内投与により変化しなかった。雌性マウスでは, LNI 後 3 日目, LNI 前と比較して有意に HWRT が低下した (LNI 前: 50.3 ± 0.6 °C, LNI 後 3 日目: 45.2 ± 0.7 °C, $p < 0.05$, $n = 6$ in each)。DMSO 大槽内投与と比較して, ピオグリタゾン大槽内投与 0.5 および 1 時間後, LNI 後 3 日目に低下した HWRT は有意に回復した (ピオグリタゾン大槽内投与群, 0.5 時間後: 50.3 ± 0.8 °C, 1 時間後: 49.7 ± 1.2 °C, $p < 0.05$, $n = 5$ in each)。

考 察

Katagiri ら¹⁸⁾ は、SD 系雄性ラットにおいて、LNI 後 1 日目より舌への機械および熱刺激に対する HWRT が有意に低下し、その HWRT 低下は三叉神経節 (TG) ニューロンの細胞体周囲の satellite glial cells に発現する ATP receptor である P2Y₁₂ receptor を介したシグナルが関与していることを明らかにした。また、舌痛覚には TRPV1 が関与することが報告されている。TRPV1 はヒト TG ニューロンの約 31% に発現していること¹⁹⁾、舌痛が発症した動物では TG ニューロンに発現する TRPV1 の増加および活性化が生じていることが報告されている²⁰⁻²²⁾。雄性 C57BL/6 マウス舌への 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid 塗付による BMS モデルに発症する舌熱痛覚過敏は、舌粘膜アルテミン遺伝子の過剰発現や TG ニューロンの p38 シグナルカスケード促進によって TG ニューロンに発現する TRPV1 感受性が増強し、舌を支配する TG ニューロンの興奮性が増大することにより惹き起こされることが報告されている^{23,24)}。本研究では、Katagiri らの報告¹⁸⁾ と同様に ICR 系マウスの LNI モデルにおいても、舌機械アロディニアおよび舌熱痛覚過敏が認められた。よって、ICR 系雄マウスおよび雌マウスにおける LNI 後の舌機械アロディニアおよび舌熱痛覚過敏も satellite glial cells に発現する P2Y₁₂ receptor を介したシグナルや舌を支配する TG ニューロンにおける TRPV1 の感受性の変化が関与している可能性が考えられる。

舌感覚の性差に関する研究は少ないが、発情前の雌性ラットは、ショ糖の摂取量が雄性ラットより多く、苦みに対する嫌悪反応は雄性ラットより有意に少ないことが報告されていることから、ラットにおける味覚応答性の調節に対する性腺ホルモンの関与が示唆される²⁵⁾。また、口腔顔面領域の痛みの性差に関する研究は、有痛性顎関節症患者や顎関

節痛モデル動物を用いて行われている。有痛性顎関節症は男性よりも女性の方が多く²⁶
²⁸⁾、その疼痛強度は月経周期によって変化することから、性ホルモンが顎関節痛強度に
関与する可能性が高いと考えられている^{29,30)}。顎関節痛モデル動物を用いた研究におい
て、エストロゲンが顎関節痛に関連する三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) ニューロンの活
動性を調節していることが報告されている³¹⁾。Bereiter ら³²⁾ はエストロゲンの1つである
エストラジオールが Vc ニューロンで産生分泌されること、卵巣摘出後の顎関節への侵害
刺激による逃避反射の増強が Vc におけるエストラジオール産生阻害により抑制されるこ
とを見出した。一方、卵巣摘出後の顎関節への侵害刺激による Vc ニューロン活動はエス
トロゲン受容体作動薬投与により減少することも報告されており、エストロゲンの Vc 内
での作用機序はいまだ不明な点が多い³³⁾。本研究で使用した LNI モデルにおける HWRT
の変化に対するエストロゲンの役割を検討する必要があるかもしれない。

Calcitonin gene-related peptide の TG 内への投与による眼窩周囲皮膚の機械アロディニア
は、雄マウスにおいてのみミクログリア活性化阻害薬の TG 内への投与によって抑制され
た³⁴⁾。三叉神経の損傷を受けた雄マウスにおける顔面部の機械アロディニアは高濃度の
ピオグリタゾンの腹腔内投与によって抑制されたが、低濃度ではその抑制効果は認められ
なかった^{35,36)}。本研究では、雄 LNI マウスにおける舌機械アロディニアはピオグリタゾ
ン (10 μ l, 76.2 mM) の大槽内投与によって抑制されなかったが、異なった投与量および投
与法における抑制効果は検討していない。したがって、高濃度のピオグリタゾン投与が雄
LNI マウスにおける舌機械アロディニアを抑制する可能性は否定できない。

中枢神経系に存在する各種免疫細胞が、侵害情報伝達系の性差に関与すると報告され

ている¹⁶⁾。その報告では、末梢神経損傷後に生じる中枢神経系における侵害情報伝達系の可塑的变化には、雄マウスではミクログリアが、雌マウスではT細胞が関与することが示唆されている。また、末梢神経損傷後に生じる異常疼痛強度は、男性ホルモンであるテストステロン依存性であることも報告されている¹⁶⁾。雄マウスで生じる顔面部異常疼痛は、延髄ミクログリアの活性化を阻害することにより抑制される³⁷⁾。一方、雌マウスで生じる異常疼痛は、T細胞に発現しているPPAR2 γ のアゴニスト投与で抑制されるが、テストステロン投与によりPPAR2 γ が減少し、疼痛抑制効果が減弱する¹⁶⁾。本研究においてLNI後の異常疼痛は、雄マウスではミクログリア活性化阻害薬であるミノサイクリン投与により、雌性マウスではPPAR2 γ アゴニストであるピオグリタゾン投与により抑制された。したがって、雄マウスではミクログリアを介したシグナル、雌マウスではT細胞に発現するPPAR2 γ を介したシグナルが異常疼痛発症に関与していると考えられる。この違いが、本研究で用いたLNIモデルに発症する舌異常疼痛の性差に関与する可能性がある。

結 論

本研究では、LNI モデルマウスに発症する舌機械アロディニアおよび熱痛覚過敏の性差に対するミクログリアおよびT細胞の役割について、行動薬理的に詳細な検討を加え、以下の結論を得た。

1. 雌雄マウスにおいて、LNI 後に舌機械アロディニアおよび熱痛覚過敏が発症した。
2. ミノサイクリン大槽内投与は、雄マウスに発症する LNI 後の舌機械アロディニアおよび熱痛覚過敏を抑制した。
3. ピオグリタゾン大槽内投与は、雌マウスに発症する LNI 後の舌機械アロディニアおよび熱痛覚過敏を抑制した。

以上より、舌神経損傷後の舌神経障害性疼痛の性差には、上行性侵害情報伝達系の興奮性を調節する免疫細胞の相違が関与することが示唆された。

文 献

- 1) Behrens M, Meyerhof W (2013) Bitter taste sensibility in humans and chimpanzees. eLS, John Wilry & Sons, Hoboken, 1-9.
- 2) Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.
- 3) Kido MA, Muroya H, Yamaza T, Terada Y, Tanaka T (2003) Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate. *J Dent Res* 82, 393-397.
- 4) Tamagawa T, Shinoda M, Honda K, Furukawa A, Kaji K, Nagashima H, Akasaka R, Chen J, Sessle BJ, Yonehara Y, Iwata K (2016) Involvement of microglial P2Y₁₂ signaling in tongue cancer pain. *J Dent Res* 95, 1176-1182.
- 5) Koyama R, Iwata K, Hayashi Y, Hitomi S, Shibuta I, Furukawa A, Asano S, Kaneko T, Yonehara Y, Shinoda M (2021) Pannexin 1-mediated ATP signaling in the trigeminal spinal subnucleus caudalis is involved in tongue cancer pain. *Int J Mol Sci* 22, 11404.
- 6) Carstens E, Saxe I, Ralph R (1995) Brainstem neurons expressing c-Fos immunoreactivity following irritant chemical stimulation of the rat's tongue. *Neurosci* 69, 939-953.
- 7) Sugiyo S, Uehashi D, Satoh F, Abe T, Yonehara N, Kobayashi M, Takemura M (2009) Effects of systemic bicuculline or morphine on formalin-evoked pain-related behaviour and c-Fos expression in trigeminal nuclei after formalin injection into the lip or tongue in rats. *Exp Brain Res* 196, 229-237.

- 8) Nakaya Y, Tsuboi Y, Okada-Ogawa A, Shinoda M, Kubo A, Chen JY, Noma N, Batbold D, Imamura Y, Sessle BJ, Iwata K (2016) ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. *Mol Pain* 12, 1744806916641680.
- 9) 日本頭痛学会・国際頭痛分類委員会 (2018) 国際頭痛分類 日本語版第3版, 医学書院, 東京, 181.
- 10) Coculescu EC, Radu A, Coculescu BI (2014) Burning mouth syndrome: a review on diagnosis and treatment. *J Med Life* 7, 512-515.
- 11) Bergdahl J, Anneroth G, Perris H (1995) Personality characteristics of patients with resistant burning mouth syndrome. *Acta Odontol Scand* 53, 7-11.
- 12) Scala A, Checchi L, Montevecchi M, Marini I, Giamberardino MA (2003) Update on burning mouth syndrome: overview and patient management. *Crit Rev Oral Biol Med* 14, 275-291.
- 13) Suarez P, Clark GT (2006) Burning mouth syndrome: an update on diagnosis and treatment methods. *J Calif Dent Assoc* 34, 611-622.
- 14) Netto FOG, Diniz IMA, Grossmann SMC, de Abreu MH, do Carmo MA, Aguiar MC (2011) Risk factors in burning mouth syndrome: a case-control study based on patient records. *Clin Oral Investig* 15, 571-575.
- 15) Imamura Y, Shinozaki T, Okada-Ogawa A, Noma N, Shinoda M, Iwata K, Wada A, Abe O, Wang K, Svensson P (2019) An updated review on pathophysiology and management of burning mouth syndrome with endocrinological, psychological and neuropathic perspectives.

- J Oral Rehabil 46, 574-587.
- 16) Sorge RE, Mapplebeck JC, Rosen S, Beggs S, Taves S, Alexander JK, Martin LJ, Austin JS, Sotocinal SG, Chen D, Yang M, Shi XQ, Huang H, Pillon NJ, Bilan PJ, Tu Y, Klip A, Ji RR, Zhang J, Salter MW, Mogil JS (2015) Different immune cells mediate mechanical pain hypersensitivity in male and female mice. *Nat Neurosci* 18, 1081-1083.
 - 17) Taradach C (1982) Monitoring of the oestrus cycle in the rat by measurement of vaginal impedance. *Arch Toxicol Suppl* 5, 184-186.
 - 18) Katagiri A, Shinoda M, Honda K, Toyofuku A, Sessle BJ, Iwata K (2012) Satellite glial cell P2Y₁₂ receptor in the trigeminal ganglion is involved in lingual neuropathic pain mechanisms in rats. *Mol Pain* 8, 23.
 - 19) Quartu M, Serra MP, Boi M, Poddighe L, Picci C, Demontis R, Del Fiacco M (2016) TRPV1 receptor in the human trigeminal ganglion and spinal nucleus: immunohistochemical localization and comparison with the neuropeptides CGRP and SP. *J Anat* 229, 755-767.
 - 20) Elitt CM, Malin SA, Koerber HR, Davis BM, Albers KM (2008) Overexpression of artemin in the tongue increases expression of TRPV1 and TRPA1 in trigeminal afferents and causes oral sensitivity to capsaicin and mustard oil. *Brain Res* 1230, 80-90.
 - 21) Kanazawa T, Matsumoto S (2014) Expression of transient receptor potential vanilloid 1 and anoctamin 1 in rat trigeminal ganglion neurons innervating the tongue. *Brain Res Bull* 106, 17-20.
 - 22) Neupane S, Jung HG, Sohn WJ, Yamamoto H, Kim JY, Byun JS, Lee Y, Bae YC, Choi JK,

- Kim JY, Jung JK (2019) Focal localization of inflammatory cytokines and neurotrophins in a tongue chronic injury model. *Arch Oral Biol* 99, 22-30.
- 23) Shinoda M, Takeda M, Honda K, Maruno M, Katagiri A, Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Tsuchiya M, Iwata K (2015) Involvement of peripheral artemin signaling in tongue pain: possible mechanism in burning mouth syndrome. *Pain* 156, 2528-2537.
- 24) Maruno M, Shinoda M, Honda K, Ito R, Urata K, Watanabe M, Okada S, Lee J, Gionhaku N, Iwata K (2017) Phosphorylation of p38 in Trigeminal Ganglion Neurons Contributes to Tongue Heat Hypersensitivity in Mice. *J Oral Facial Pain Headache* 31, 372-380.
- 25) Clarke SN, Ossenkopp KP (1998) Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. *Am J Physiol* 274, 718-724.
- 26) Bush FM, Harkins SW, Harrington WG, Price DD (1993) Analysis of gender effects on pain perception and symptom presentation in temporomandibular pain. *Pain* 53, 73-80.
- 27) Leresche L (1997) Epidemiology of temporomandibular disorders: implications for the investigation of etiologic factors. *Crit Rev Oral Biol Med* 8, 291-305.
- 28) Stohler CS (1997) Masticatory myalgias: Emphasis on the nerve growth factor-estrogen link. *Pain Forum* 6, 176-180.
- 29) Isselée H, De Laat A, De Mot B, Lysens R (2002) Pressure-pain threshold variation in temporomandibular disorder myalgia over the course of the menstrual cycle. *J Orofac Pain* 16, 105-117.
- 30) LeResche L, Mancl L, Sherman JJ, Gandara B, Dworkin SF (2003) Changes in

- temporomandibular pain and other symptoms across the menstrual cycle. *Pain* 106, 253-261.
- 31) Okamoto K, Tashiro A, Hirata H, Bereiter DA (2005) Differential modulation of TMJ neurons in superficial laminae of trigeminal subnucleus caudalis/upper cervical cord junction region of male and cycling female rats by morphine. *Pain* 114, 203-211.
- 32) Bereiter DA, Thompson R, Rahman M (2019) Sex differences in estradiol secretion by trigeminal brainstem neurons. *Front Integr Neurosci* 13, 3.
- 33) Tashiro A, Okamoto K, Bereiter DA (2012) Rapid estrogenic effects on TMJ-responsive brainstem neurons. *J Dent Res* 91, 210-214.
- 34) Araya EI, Turnes JM, Barroso AR, Chichorro JG (2020) Contribution of intraganglionic CGRP to migraine-like responses in male and female rats. *Cephalalgia* 40, 689-700.
- 35) Lyons DN, Zhang L, Danaher RJ, Miller CS, Westlund KN (2017) PPAR γ agonists attenuate trigeminal neuropathic pain. *Clin J Pain* 33, 1071-1080.
- 36) Lyons DN, Zhang L, Pandya JD, Danaher RJ, Ma F, Miller CS, Sullivan PG, Sirbu C, Westlund KN (2018) Combination drug therapy of pioglitazone and D-cycloserine attenuates chronic orofacial neuropathic pain and anxiety by improving mitochondrial function following trigeminal nerve injury. *Clin J Pain* 34, 168-177.
- 37) Ma F, Zhang L, Lyons D, Westlund KN (2012) Orofacial neuropathic pain mouse model induced by trigeminal inflammatory compression (TIC) of the infraorbital nerve. *Mol Brain* 5, 44.



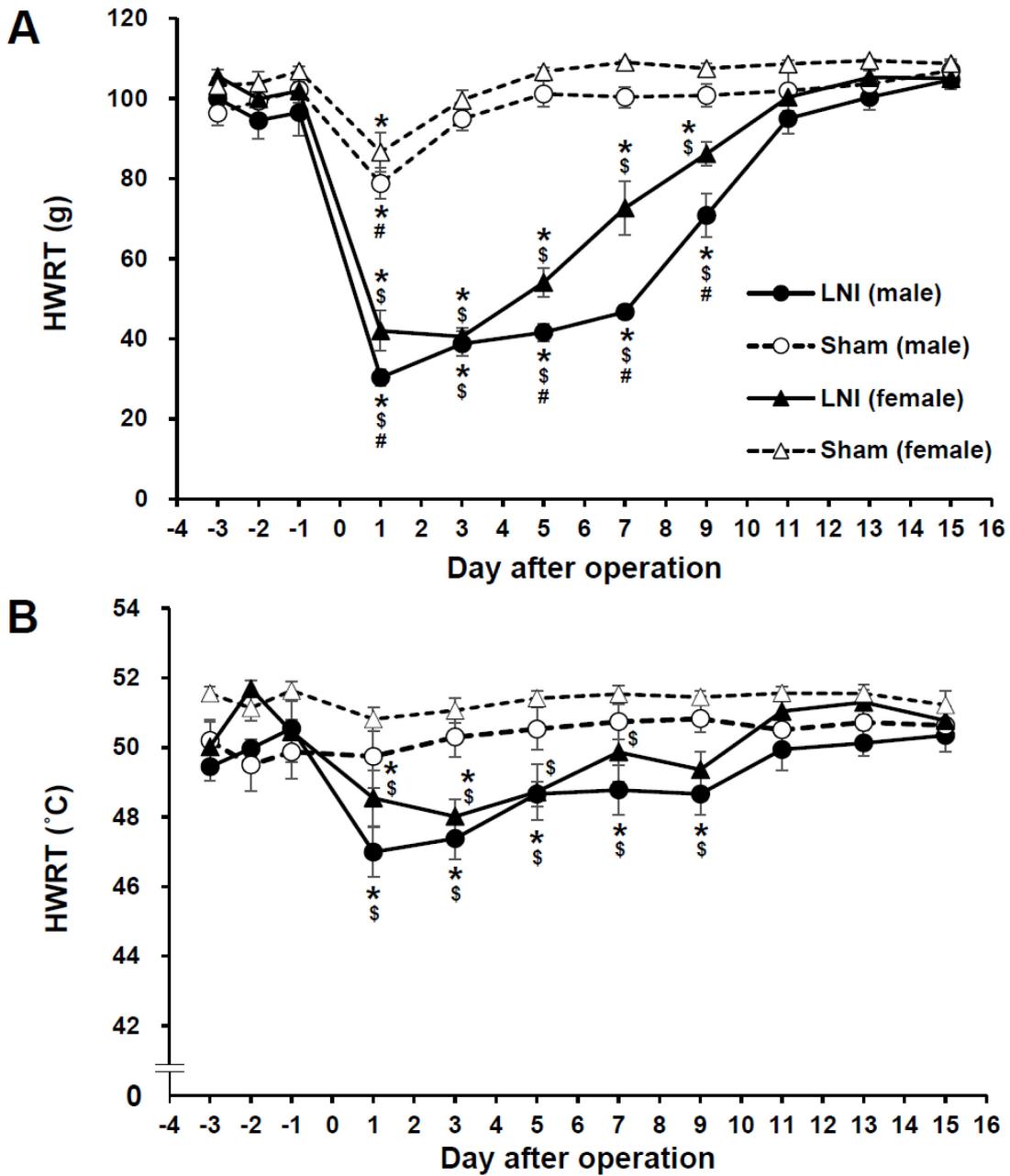


図1 LNI後の舌への機械または熱刺激に対するHWRTの変化

(A) 舌への機械刺激に対するHWRT。(B) 舌への熱刺激に対するHWRT。* $p < 0.05$ vs.

HWRT on Day -1. \$ $p < 0.05$ vs. HWRT in Sham. # $p < 0.05$ vs. HWRT in female.

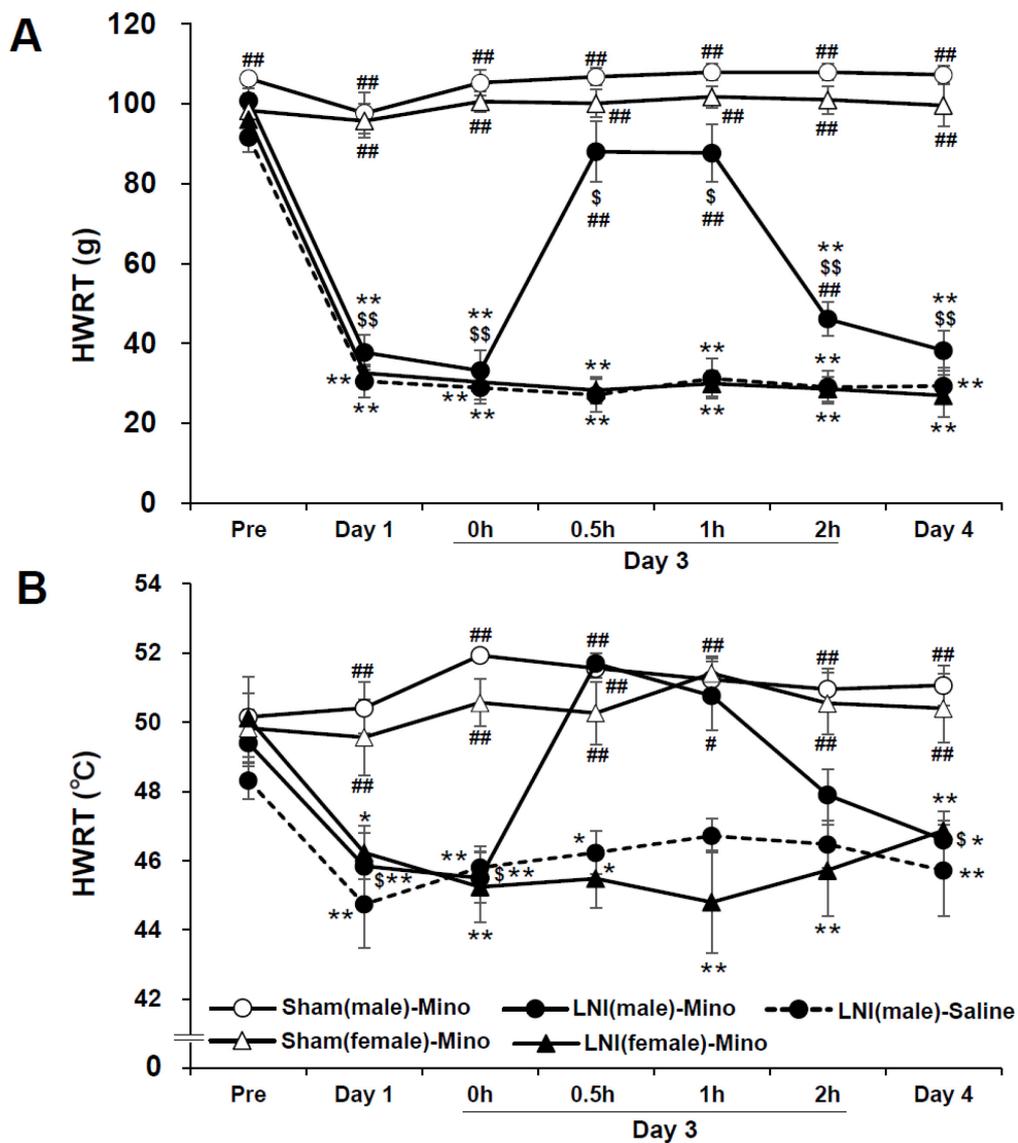


図2 LNI後のHWRT低下に対するミノサイクリンの効果

(A) 舌への機械刺激に対する HWRT。(B) 舌への熱刺激に対する HWRT。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. HWRT on Pre。\$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ vs. Sham(male)-Mino。# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. LNI (male)-Saline。Mino : ミノサイクリン。

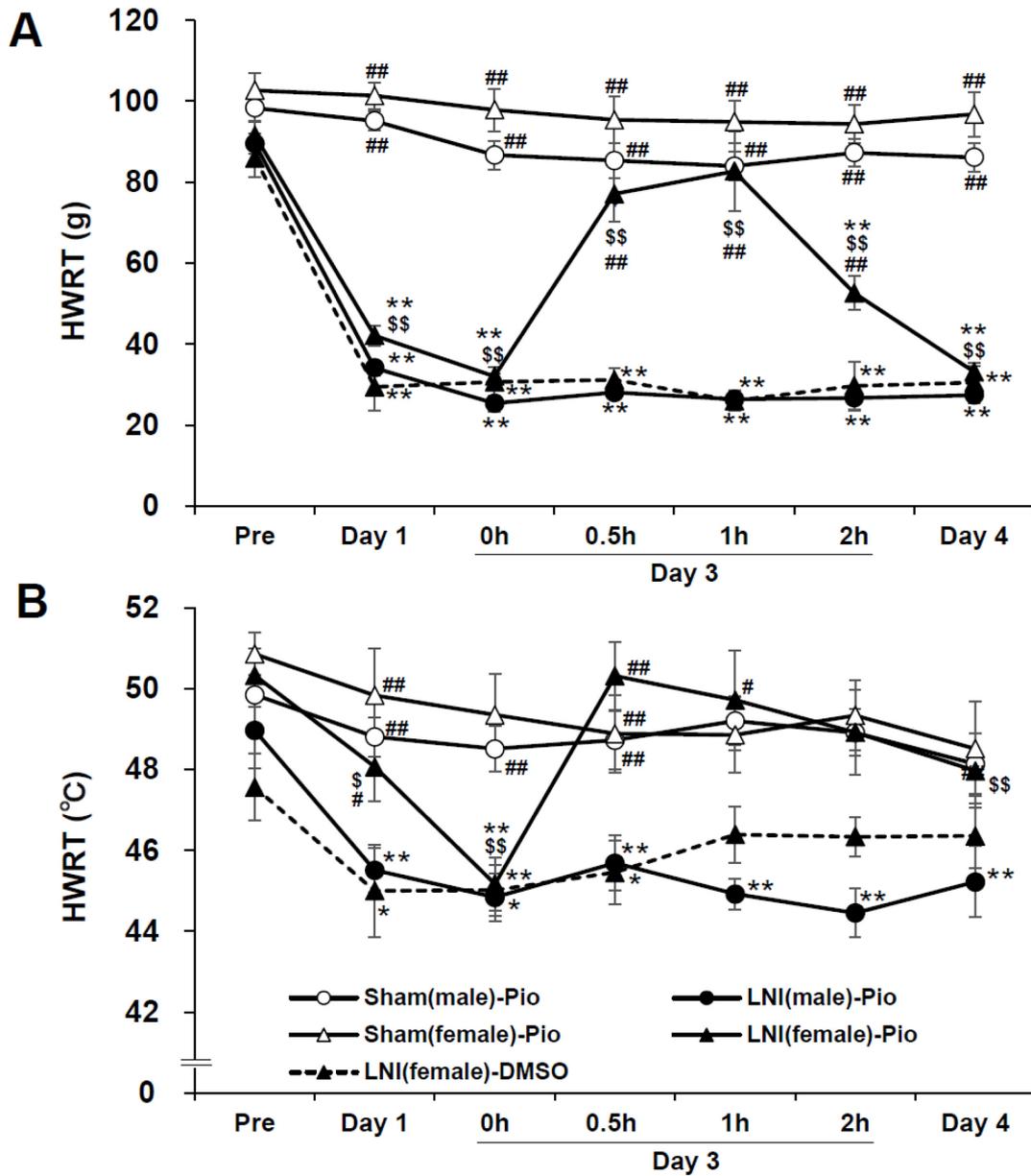


図3 LNI後のHWRT低下に対するピオグリタゾンの効果

(A) 舌への機械刺激のHWRT。(B) 舌への熱刺激のHWRT。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. HWRT on Pre。\$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ vs. Sham(female)-Pio。# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. LNI(female)-DMSO。Pio : ピオグリタゾン。